



دانشگاه علوم پزشکی کرمان

دانشکده پزشکی

پایان نامه مقطع دکترای تخصصی (Ph.D)

عنوان:

بررسی و مقایسه **miRNA** های اکینو کوکوس گرانولوزوس در مراحل
مختلف تکاملی انگل و تأثیر مداخله دارویی بر میزان بیان آنها

توسط:

سیف اله مرتضائی

استاد راهنما:

دکتر مجید فصیحی هرندي

اساتيد مشاور:

دکتر علی افگار - دکتر بلال صادقی

سال تحصیلی:

شماره پایان نامه: ۵۳۰

تیرماه ۱۳۹۸



دانشگاه علوم پزشکی کرمان

مدیریت تحصیلات تکمیلی دانشگاه

بسمه تعالی

صور تجلیسه دفاع از پایان نامه

تاریخ: ۹۸/۴/۲۴

شماره: ۹۸/۳/۵۳۰

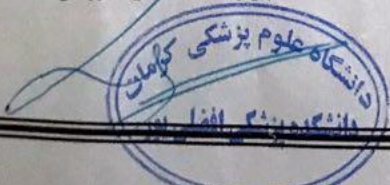
پیوست:

جلسه دفاعیه پایان نامه تحصیلی آقای سیف اله مرتضائی دانشجوی دکتری تخصصی (Ph.D) رشته انگل شناسی پزشکی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمان تحت عنوان "بررسی و مقایسه miRNA های اکتینوکوکوس گرانولوزوس در مراحل مختلف تکاملی انگل و تأثیر مداخله دارویی بر میزان بیان آنها" در ساعت ۱۰ صبح روز یکشنبه مورخ ۹۸/۴/۲۳ با حضور اعضای محترم هیات داوران به شرح ذیل:

سمت	نام و نام خانوادگی	امضا
الف: استاد راهنما	جناب آقای دکتر مجید فصیحی هرندي	
ب: استادان مشاور	جناب آقای دکتر علی افگار جناب آقای دکتر بلال صادقی	
ج: عضو هیات داوران (داخلی)	جناب آقای دکتر ناصر ضیاعلی	
ج: عضو هیات داوران (داخلی)	سرکار خانم دکتر مهدیه نظری رباطی	
د: عضو هیات داوران (خارجی)	جناب آقای دکتر بهرام کاظمی	
د: عضو هیات داوران (خارجی)	سرکار خانم دکتر فاطمه غفاری فر	
ه: نماینده تحصیلات تکمیلی	جناب آقای دکتر پویا قاسمی نژاد	

تشکیل گردید و ضمن ارزیابی به شرح پیوست با درجه عالی و نمره ۲۰/۱ مورد تأیید قرار گرفت.

مهر و امضاء معاون آموزشی



چکیده:

زمینه و اهداف: بیماری کیست هیداتید (سیستیک اکینوкокوزیس) که توسط انگل اکینوкокوس گرانولوزوس ایجاد می شود، از مهمترین بیماری های مشترک انسان و حیوان محسوب می شود. کرم بالغ ساکن در روده کوچک سگ و سگ سانان به عنوان میزبان نهایی باعث انتشار تخم انگل در محیط زیست می شود. سپس این تخم ها باعث آلودگی انسان و سایر حیوانات به عنوان میزبان های واسط می شوند. اکینوкокوزیس یک بیماری مزمن در انسان و سایر علف خواران اهلی و وحشی است که منجر به ایجاد کیست می شود. زیان های اقتصادی و پزشکی حاصل از این بیماری مخصوصا در جوامع و کشورهای در حال توسعه قابل توجه است. بنابراین شناخت بیولوژی و فرآیند تکامل این انگل در هر دو میزبان های نهایی و واسط دارای اهمیت ویژه ای است زیرا با یافتن استراتژی های جدید در کنترل بیماری به ما کمک می کند.

مولکول های miRNA توالی های غیر کد شونده و تک رشته ای با ۱۸-۲۵ نوکلئوتید هستند که بیان ژن را در مراحل پس از ترجمه تنظیم می کنند. این ریز مولکول ها در طیف وسیعی از فرآیندهای بیولوژیکی و ارتباط با میزبان از جمله تکامل اندام ها، تمایز سلولی، متابولیسم، تنظیم بیان ژن، پروسه های تکامل و فیزیولوژی و الگوهای مختص بیماری نقش دارند. به خاطر گستردگی پتانسیل های تنظیمی و داشتن توالی های اختصاصی، miRNA ها می توانند به عنوان هدف های دارویی و ابزارهای تشخیصی برای بیماری های انگلی مورد استفاده قرار گیرند.

آلبندازول به عنوان یک داروی ضد انگل از دسته بنزیمیدازول ها در بافت های پستانداران و ترشحات و پلاسمای آنها به فرمهای آلبندازول سولفوکساید و آلبندازول سولفون تبدیل می شود. مطالعات نشان داده اند که این ترکیبات در درمان اکینوкокوزیس مؤثر و بدون عوارض جدی هستند. وجود مقاوت و یا کاهش پاسخ آلبندازول و سایر بنزیمیدازول ها در درمان چند انگل کرمی که دارای اهمیت پزشکی و دامپزشکی هستند گزارش شده است. ژنتیک و چگونگی عملکرد آلبندازول در اکینوкокوس گرانولوزوس و نقش میکروآران ای ها در تنظیم هدف های ژنی مرتبط با این دارو به خوبی شناخته نشده است. علاوه

برآن miRNA ها می توانند در سرم یا پلاسما میزبان عفونی قابل شناسایی باشند. این موضوع جالبی برای بررسی نقش miRNA ها به عنوان یک بیومارکر برای ارزیابی پاسخ به درمان تلقی می شود. پتانسیل انگل اکینوкокوس گرانولوزوس برای رشد آزمایشگاهی در محیط های کشت مونوفازیک و دی فازیک این امکان را به ما می دهد که میکروسیست و کرم های سگمانته را بدست آوریم. هدف از مطالعه حاضر مقایسه و پروفایل بیان تعدادی از miRNA های منتخب (Let-7, egr-miR-1, egr-miR-10, egr-mir-125, egr-miR-190, sja-miR-133, sja-miR-125a, egr-miR-3489, sja-miR-8185, sja-miR-2d, miR-61) در مراحل تکاملی انگل اکینوкокوس گرانولوزوس شامل پروتواسکولکس اینواژینه، پروتواسکولکس اوژینه، کرم سگمانته تک بندی، کرم سگمانته سه بندی، لایه زایا و میکروسیست بود. علاوه بر آن تأثیر داروی آلبندازول سولفوکساید بر بیان تعدادی از این miRNA ها در برخی از مراحل تکاملی انگل مقایسه گردید.

روش ها: مراحل تکاملی انگل حاصل از کیست هیداتید و کشت آزمایشگاهی انگل بدست آمد. استخراج miRNA ها از مراحل تکاملی لایه زایا، پروتواسکولکس، پروتواسکولکس اوژینه، کرم سگمانته تک بندی و کرم سگمانته سه بندی و میکروسیست انجام شد. بیان miRNA ها ی منتخب با استفاده از متد Real time quantitative PCR در هر مرحله تکاملی انجام شد. علاوه برآن بیان برخی از miRNA های منتخب (Let-7, miR-61, miR-3489) در مواجهه با داروی آلبندازول سولفوکساید در چهار مرحله تکاملی انگل شامل پروتواسکولکس، میکروسیست، کرم سگمانته تک بندی و کرم سگمانته سه بندی مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته ها: در مطالعه حاضر ژنوتیپ انگل با استفاده از ژن Cox1 ژنوتیپ G1 تشخیص داده شد. در بررسی بیان miRNA ها از تعداد یازده miRNA ی مورد بررسی تعداد نه miRNA در مراحل مختلف تکاملی انگل فعال بوده و بیان نشان دادند. یک افزایش بیان معنی داری از miR-61 در لایه زایا و در هنگام تبدیل پروتواسکولکس به میکروسیست مشاهده گردید ($p < 0.5$). اگرچه بیان بیشتری از miR-10 در کرم های سگمانه سه بندی نسبت به سایر مراحل مشاهده شد ($p < 0.5$). همچنین let-

miR-133, miR-3489 افزایش بیان معنی داری در لایه زایا نشان دادند ($p < 0.5$). در این مطالعه آثاری از بیان miR-8185, miR-2d در هیچ یک از مراحل تکاملی مشاهده نگردید. یافته های تاثیر داروی آلبندازول سولفوکساید بر بیان نشان داد که با کاهش غلظت میزان بیان let-7 در کرم سگمانته تک بندی افزایش داشته است. این افزایش در غلظت های ۱۲۵ و ۶۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر معنی دار شده است ($p < 0.05$). همچنین با کاهش غلظت دارو بیان let-7 نیز در میکروسیست کاهش یافته است. این کاهش بیان در غلظت های ۱۰ و ۵ میکروگرم بر میلی لیتر نسبت به نمونه کنترل معنی دار شده است ($p < 0.05$). نتایج نشان داد که تنها غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر باعث کاهش بیان معنی داری let-7 در پروتواسکولکس نسبت به کنترل نشان داده است ($p < 0.05$).

با کاهش غلظت مخصوصا از غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به بعد میزان بیان miR-61 در کرم سگمانته تک بندی افزایش یافته است. این افزایش بیان در غلظت ۶۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر نسبت به نمونه کنترل معنی دار شده است ($p < 0.05$). همچنین نتایج نشان داد که بیان miR-61 در میکروسیست تمام غلظت ها باعث کاهش بیان شده اند. این کاهش بیان در غلظت های ۵۰، ۱۰ و ۵ میکروگرم بر میلی لیتر معنی دار شده است ($p < 0.05$). نتایج نشان داد که دو غلظت ۱۰۰۰ و ۶۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر باعث افزایش بیان معنی داری miR-61 در پروتواسکولکس شده است ($p < 0.05$). تاثیر داروی آلبندازول بر بیان miR-3489 را در کرم سگمانته تک بندی نشان داد که کرم های سگمانته تک بندی در غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر افزایش معنی داری را نسبت به کنترل بدون دارو دارند ($P < 0.05$).

نتیجه گیری: نتایج مطالعه حاضر نشان داد که اکثر miRNA های مورد مطالعه در شیتوزوما و اکینوкокوس به صورت ریز مولکول های حفاظت شده در کرم های پهن هستند. اگرچه هیچ شاهی دلیل بر وجود miR-8185, miR-2d در انگل اکینوкокوس گرانولوزوس مشاهده نشد. با توجه به کشت آزمایشگاهی انگل اکینوкокوس در دومسیر مختلف، این امکان وجود دارد که جهت گیری و مسیر انگل از پروتواسکولکس برای ایجاد میکروسیست و دیگری در مسیر تکامل کرم های سگمانته متأثر از

نقش تنظیمی miRNA ها باشد. علاوه بر آن مطالعه حاضر نشان داد که داروی آلبندازول سولفوکساید باعث تغییر بیان miR-61,let-7 در مرحله تکاملی میکروسپیست شده است در حالیکه سایر مراحل تکاملی بیان متفاوت و بدون الگویی از خود نشان دادند.

کلمات کلیدی: اکینوکوکوس گرانولوزوس، Small RNA ، miRNA ، مراحل تکاملی ، کشت انگل ، کرم های پهن، مداخله دارویی ، بنزیمیدازول

Abstract:

Back ground and objectives: Cystic Echinococcosis (CE) caused by *Echinococcus granulosus* is a major parasitic zoonosis of human and animals. Adult worm in the small intestine of dog as definitive host excrete eggs in the environment, which infect human and other animal intermediate hosts. CE is a chronic parasitic cyst-forming disease of human beings as well as domestic and wild ungulates. The medical and economic impact of CE has been shown to impose a great burden on the societies particularly in developing countries. Therefore, understanding the biology and developmental processes of the parasite in both definitive and intermediate hosts is of principal importance since it may help to find new strategies for the control of the disease.

Micro-RNAs are non-coding, single-stranded RNA consisting of 18-25 nucleotides that regulate gene expression at the post-transcriptional level. These small regulators of gene expression are known to be involved in a broad variety of biological processes and host-parasite interactions, such as organ development, cellular differentiation, metabolism and proliferation,

gene regulation, development and evolutionary processes, disease-specific patterns and physiological processes. Because of their wide regulatory potential as well as sequence specificity, miRNAs can serve as drug targets, resistance factors and diagnostic tools for parasitic diseases.

Albendazole (ABZ) as the main anti-echinococcal benzimidazole, is extensively metabolized in mammal's tissues, plasma and excreta to produce albendazole sulfoxide (ABZ-SOX) and albendazole sulfone. These compounds have demonstrated safe and effective therapeutic outcomes in the treatment of echinococcosis. The emergence of resistance or reduced response to ABZ and other benzimidazoles has been demonstrated in several parasitic helminths of medical and veterinary importance. The genetic basis of ABZ function against *E. granulosus* and the role of miRNAs in regulating target genes involved in the drug action are poorly understood. In addition there is evidence suggesting that miRNAs can be detected in the infected host serum/plasma. This has raised interest in evaluating miRNAs as potential new biomarkers for assessing the response to chemotherapy.

The phenomenal capacity of *E. granulosus* for bi-directional development in monophasic and di-phasic media enables us to produce in vitro segmented worms as well as microcysts.

The purpose of the present study was to compare the activity of a selected profile of miRNAs (Let-7, egr-miR-1, egr-miR-10, egr-mir-125, egr-miR-190,

sja-miR-133, sja-miR-125a, egr-miR-61, sja-miR-2d, sja-miR-8185, sja-miR-3489) in different developmental stages of *E. granulosus* including native protoscoleces and germinal layers; and harvested stages from in-vitro cultivation i.e. evaginated protoscoleces, microcysts and strobilated worms with one and three proglottids. Then we comparison the effect of ABZ-SOX on expression of some miRNAs in some developmental stages.

Methods: Different developmental stages of the parasite were obtained from *ex vivo* as well as *in vitro* cultured *E. granulosus*. MicroRNAs were extracted from the *ex vivo* germinal layer and invaginated protoscoleces as well as the *in vitro* generated microcysts, evaginated protoscoleces and strobilated worms. Expression of the selected miRNAs was evaluated by RT-qPCR for each stage. Furthermore, we investigate the differential expression of some miRNAs (Let-7, miR-61, miR-3489) in four developmental stages of *E. granulosus* exposed to ABZ-SOX.

Results: The parasite was identified as *E. granulosus* sensu stricto G1 genotype as confirmed by cox1 PCR sequencing .the result of miRNAs expression showed that nine out of eleven miRNAs were present and active in different developmental stages of *E. granulosus*. A significant over-expression of miR-61 was observed in germinal layer and during the protoscolex transformation into the microcysts ($p < 0.05$), however miR-10 was more expressed in the mature strobilated forms than the other stages. Let-7, miR-3489 and mir-133 showed a high expression in germinal layer.

We did not find any evidence of miR-8185 and miR-2d expression in any of the tested developmental stages of *E. granulosus*.

The results of miRNA expression profile of the parasites exposed to ABZ-SOX showed that

expression levels of let-7 were inversely associated with the drug concentration with significant differences at 125 and 62.5 µg/ml concentrations against control ($p < 0.05$).

In microcysts higher ABZ-SOX concentrations produced no significant change in let-7 expression, however decreased miRNA expression was observed in lower drug concentrations ($p < 0.05$). In the treated protoscoleces, let-7 expression was significantly diminished in the presence of ABZ-SOX at 1000 µg/ml concentration ($p < 0.05$). In one-proglottid worms, increased expression level of mir-61 was documented at 62.5 µg/ml concentration ($p < 0.05$). Overall, miR-61 revealed a significant decrease of expression in the microcysts exposed to different drug concentrations ($p < 0.05$). Significantly higher miR-61 expressions were observed in the protoscoleces at 1000 and 62.5 µg/ml concentrations ($p < 0.05$). In one-proglottid worms, increased expression level of miR-3489 was recognized at 500 µg/ml concentration ($p < 0.5$).

Conclusion: Results of the present study indicate that several similar miRNAs in *Schistosoma* and *Echinococcus* are considered as conserved small RNAs in the Platyhelminthes. However no evidence of miR-8185 and miR-2d were found in *E. granulosus* while this miRNA has already been found in

S. japonicum. Regarding the bi-directional nature of *Echinococcus* cultivation in vitro, the direction of development of protoscoleces either into an adult worm or to a secondary hydatid cyst might be attributed to the regulatory role of miRNAs in different life stages of the parasite development. Furthermore, the results of the present study demonstrated that under *in vitro* benzimidazole exposure the expression of two *E. granulosus* miRNAs (let-7, miR-61) were significantly affected in the microcyst stage, however other developmental stages exhibited different reactive expressions against ABZ-SOX.

Key words: *E. granulosus*; miRNAs; Development; Cultivation; Platyhelminthes, Anthelmintic, Benzimidazole



Kerman University of Medical Sciences

Faculty of Medicine

In Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree (PhD)

Title:

**Study and comparison of *Echinococcus granulosus* miRNAs in
different developmental stages of the parasite and drug
intervention on their expression**

By:

Seifollah Mortezaei

Supervisor:

Prof. Majid Fasihi Harandi

Advisors:

1-Dr. Ali Afgar | 2-Dr. Balal Sadeghi

Thesis No: **530**

Date: **July, 2019**